

540,047

**(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

**(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual**
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
29 de Julio de 2004 (29.07.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/063395 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:** C12Q 1/68 **(74) Mandatario:** ELZABURU, Alberto, de; Miguel Angel, 21, 28010 Madrid (ES).
- (21) Número de la solicitud internacional:** PCT/ES2003/000666 **(81) Estados designados (nacional):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Fecha de presentación internacional:** 29 de Diciembre de 2003 (29.12.2003) **(84) Estados designados (regional):** patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Idioma de presentación:** español
- (26) Idioma de publicación:** español
- (30) Datos relativos a la prioridad:** P200300054 10 de Enero de 2003 (10.01.2003) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):** FUNDACION PARA LA INVESTIGACION CLINICA Y MOLECULAR DEL CANCER DE PULMON [ES/ES]; Villaroel 251, Pral. 2ª, 08036 Barcelona (ES).
- (72) Inventores; e**
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):** ROSELL COSTA, Rafael [ES/ES]; Villaroel 251, Pral. 2ª, 08036 Barcelona (ES). TARON ROCA, Miguel [ES/ES]; Villaroel 251, Pral. 2ª, 08036 Barcelona (ES).
- Publicada:**
— con informe de búsqueda internacional
- Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

(54) Title: DEVICE FOR ASSAYING POLYMORPHISMS OF GENE XPD/ERCC2 FOR THE CORRECT ADMINISTRATION OF CHEMOTHERAPY FOR LUNG CANCER

(54) Título: DISPOSITIVO DE ENSAYO DE POLIMORFISMOS DEL GEN XPD/ERCC2 PARA LA CORRECTA ADMINISTRACION DE QUIMIOTERAPIA EN CANCER DE PULMON

(57) Abstract: The invention relates to the technical field of lung cancer treatment involving the use of antitumour medicaments and, more specifically, to the development of a diagnosis device which can be used to treat each patient with the most effective medicament according to the polymorphism presented for the XPD gene. The inventive assay device is based on the polymorphic variants of the XPD gene in exon 23 (A-C, Lys 751 Gln) and in exon 10 (G-A, Asp312Asn) and on the development of specific primers which can be used to detect said polymorphisms using PCR or automatic DNA sequencing.

(57) Resumen: La invención se adscribe al sector técnico del tratamiento del cáncer de pulmón por parte de fármacos anti-tumorales y, en concreto, desarrolla un dispositivo de diagnóstico que permite tratar a cada paciente con el fármaco más efectivo según el polimorfismo que presenten para el gen XPD. El dispositivo de ensayo de la invención se basa en las variantes polimórficas del gen XPD en el exon 23 (A-C, Lys 751 Gln) y en el exon 10 (G-A, Asp312Ans) y en el desarrollo de cebadores específicos que permitan detectar dichos polimorfismos por PCR o mediante secuenciación automática de ADN.

WO 2004/063395 A1

Dispositivo de ensayo de polimorfismos del gen XPD/ERCC2 para la correcta administración de quimioterapia en cáncer de pulmón

Ambito de la invención

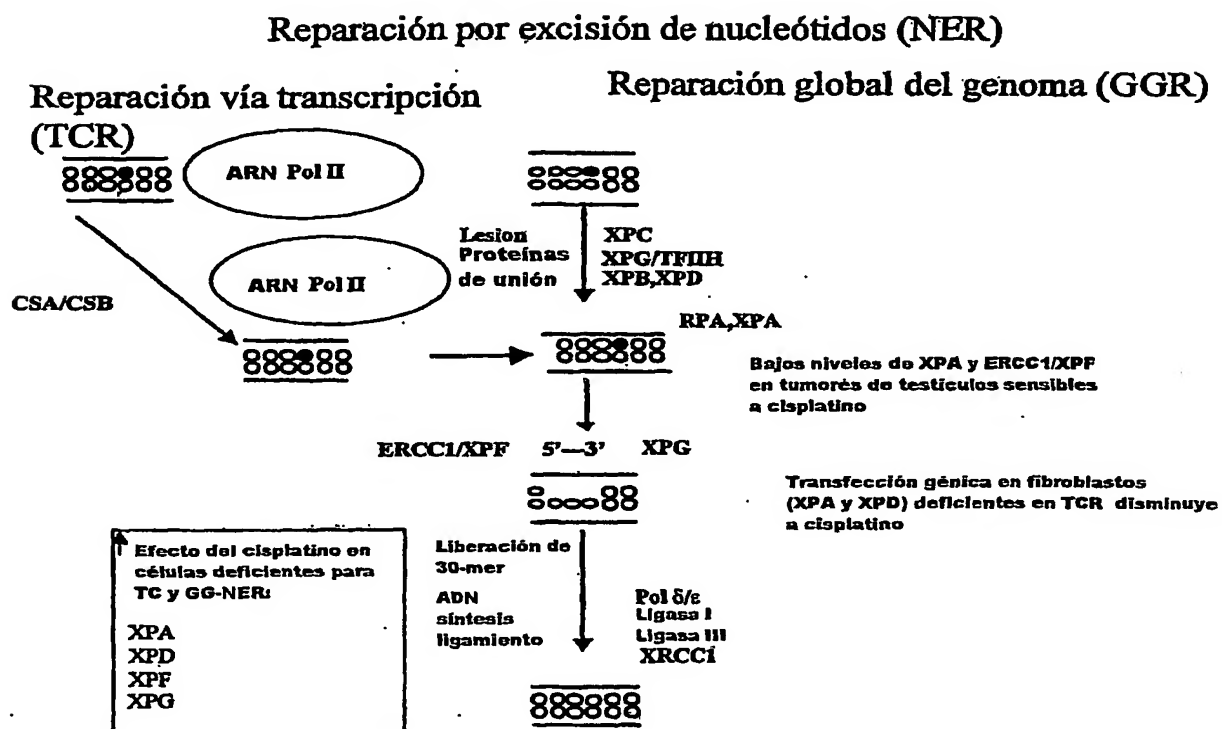
- 5 La invención se adscribe al sector técnico del tratamiento del cáncer de pulmón por parte de fármacos antitumorales y, en concreto, desarrolla un dispositivo de diagnóstico que permite tratar a cada paciente con el fármaco más efectivo según el polimorfismo que presenten para el gen XPD.

10 **Estado de la Técnica**

- Diversos fármacos antitumorales lesionan el ADN de forma similar al que efectúan los carcinógenos. La unión covalente del carcinógeno o de un fármaco antitumoral citotóxico depara la formación de una base del ADN que se altera químicamente, lo que se conoce con el término de aducto (Philips,2002). El cisplatino
- 15 causa uniones entre las cadenas del ADN y tales aductos proporcionan la acción citotóxica del cisplatino (Siddik,2002). Los sistemas de reparación del ADN son esenciales para la eliminación de los aductos de cisplatino. El *Nucleotide Excision Repair* (NER) es la principal vía para proteger al huésped del desarrollo de un cáncer de pulmón y al mismo tiempo es el principio de generación de resistencia al cisplatino. De hecho,
- 20 tanto los aductos del benzopireno diol epóxido (BPDE) y también los aductos del cisplatino bloquean de forma eficaz la ARN polimerasa II y de este modo anulan la transcripción (Hanawalt,2001). Estas lesiones del ADN se eliminan por el sistema NER que a su vez se subdivide en dos vías metabólicas: *Transcription Coupled Repair* (TCR) y *Global Genomic Repair* (GGR) (Esquema 1). De manera importante el TCR (o TC-
- 25 NER) repara las lesiones que bloquean la transcripción en la hebra que transcribe el ADN de genes activos, mientras que el GGR (o GG-NER) repara las lesiones en la hebra que no transcribe en los genes activos y también en el genoma sin función de transcripción (Cullinane et al,1999; May et al,1993; McKay et al,1998).

-2-

Esquema 1: Representación de las vías de reparación de excisión de nucleótidos (NER)



-3-

En los seres humanos, el NER es un mecanismo fundamental de defensa contra los efectos carcinogénicos de la luz solar y ciertos defectos genéticos en las vías reparadoras causan graves consecuencias en trastornos hereditarios autosómicos recesivos, como es el xeroderma pigmentosum (XP). En efecto, los pacientes con esta enfermedad sufren

5 hipersensibilidad a la luz solar con una extraordinaria susceptibilidad y alta frecuencia de padecer cáncer cutáneo. En el XP, hay siete grupos complementarios que pueden ser deficientes en las vías del NER. Estos genes se enumeran del XPA al XPG. En la enfermedad XP, estos genes son defectuosos en ambas vías del NER (Conforti et al,2000). En cáncer de ovario y en menos frecuencia, en cáncer de colon y cáncer de

10 pulmón, se ha observado pérdidas de heterocigosidad en diversos genes XP (Takebayashi et al, 2001). La pérdida de heterocigosidad se relaciona con la pérdida de transcripción y la deficiencia de estos genes conlleva un aumento de sensibilidad al cisplatino, como se ha observado en el cáncer de ovario. El síndrome de Cockayne (CS) es otra enfermedad fotosensitiva que se vincula a déficit en el sistema NER. Dos genes se han identificado, el

15 CSA y el CSB. Las alteraciones de dichos genes perturban las funciones que se involucran en la vía TCR (Conforti et al,2000).

En la parte izquierda del Esquema 1 (modificada de Rajewsky y Müller, 2002) se muestra la vía TCR que es la esencial para detectar el daño que causa el cisplatino (Cullinane et al,1999). En el momento de la transcripción, cuando el ARN polimerasa II

20 detecta la lesión, los factores específicos de transcripción CSA y CSB se activan en la vía molecular del NER (Furuta et al, 2002; McKay et al, 2001). Los genes XP también se involucran en la vía TCR, tal como se muestra en el recuadro del Esquema 1. En esencia, diversos déficits moleculares en ambas vías (GGR y TCR) en fibroblastos confieren un incremento de la sensibilidad al efecto citotóxico de cisplatino en comparación al que

25 ocurre en fibroblastos normales. Importante, cualquier déficit en alguno de los genes XPA, XPD, XPF o XPG confiere un incremento sustancial de la actividad del cisplatino (Furuta et al, 2002).

Como principio común, el elenco de citotóxicos que se usan en el tratamiento del cáncer, en particular en cáncer de pulmón, se vertebran alrededor del uso del cisplatino o

30 carboplatino en asociación a otro fármaco tal como la gemcitabina, docetaxel, paclitaxel o vinorelbina como más importantes y de uso clínico habitual. Sin embargo, los

-4-

resultados de la quimioterapia en cáncer de pulmón metastásico son muy limitados con una mediana de tiempo a la progresión que no rebasa los cinco meses y una mediana de supervivencia que no excede de los ocho o diez meses. Ningún tipo de combinación sobresale en mejorar tales expectativas de supervivencia. Sin embargo, de forma individual, como comprobación clínica, suele constatar que casos individuales tienen supervivencias significativamente más largas. Los polimorfismos que son simples cambios de nucleótidos, confieren diferencias interindividuales que alteran la función o la expresión de genes. Tales polimorfismos que existen en una proporción muy elevada en el genoma están todavía en vías de estudio. Es posible que en un futuro se caractericen más de 3000 polimorfismos que sean útiles para determinar la susceptibilidad a cáncer, el valor pronóstico de la enfermedad y el valor predictivo de respuesta al tratamiento. A nivel de expresión del ARN mensajero se ha constatado que la sobreexpresión del gen ERCC1 que actúa en la vía GGR provoca resistencia al cisplatino en cáncer gástrico, de ovario y de pulmón (Lord et al, 2002; Metzger et al, 1998; Shirota et al, 2001).

Los polimorfismos XPD se han vinculado a una disminución de la capacidad reparadora del ADN en diversos estudios (Spitz et al, 2001). En efecto, aproximadamente la mitad de la población poseen el genotipo Lys751Lys y también tienen el genotipo homocigoto normal Asp312Asp. Tales pacientes o personas con genotipo homocigoto normal, tienen muy buena capacidad reparadora y por lo tanto pueden ser resistentes al cisplatino (Bosken et al, 2002). La elevación de la capacidad reparadora que se puede medir mediante ensayos funcionales se ha asociado a resistencia al cisplatino en cáncer de pulmón de célula no pequeña (*non small cell lung cancer*, NSCLC) (Zeng-Rong et al, 1995). La capacidad reparadora también se ha estudiado mediante la medición de la reactivación de un gen dañado por exposición al BPDE y los niveles de capacidad reparadora son significativamente más bajos en enfermos con cáncer de pulmón que en controles (Wei et al, 1996, 2000). Múltiples estudios señalan que la merma de la capacidad reparadora y el incremento en los niveles de aductos del ADN incrementa el riesgo de cáncer de pulmón. Así, la expresión basal de genes críticos en la vía NER guarda relación con el riesgo de cáncer de pulmón. Por RT-PCR, los niveles de transcritos de ERCC1, XPB, XPG, CSB y XPC, fueron medidos en linfocitos de 75 enfermos con cáncer de pulmón y 95 controles. Los resultados mostraron un decremento

5

significativo en los niveles de expresión de XPG y CSB en los casos de cáncer de pulmón en comparación con los controles (Cheng et al, 2000). Muy importante, los niveles de ARN mensajero en linfocito de los genes XPA, XPB, XPC, XPD, XPF, XPG, ERCC1 y CSB demostró una correlación muy significativa en los niveles de ARN mensajero entre
5 ERCC1 y XPD, a su vez, la expresión de ambos genes se correlaciona con la capacidad reparadora del ADN (Vogel et al, 2000).

Existen patentes (WO 97/25442) acerca de métodos de diagnóstico del cáncer de pulmón, así como de otros tipos de tumores (WO 97/38125, WO 95/16739) basadas en la detección de otros polimorfismos diferentes a los aquí descritos. Asimismo hemos
10 localizado otras patentes que también utilizan la detección de polimorfismos en otros genes para conocer la respuesta de determinados pacientes a otros fármacos (estatinas); pero no conocemos patentes que determinen qué pacientes con cáncer de pulmón son más proclives a un tratamiento antitumoral o a otro.

15 Bibliografía

1. Aloyz R, Xu ZY, Bello V, et al. Regulation of cisplatin resistance and homologous recombination repair by the TFIIH subunit XPD. Cancer Res 2002; 62:5457-5462
2. Bosken CH, Wei Q, Amos CI, Spitz MR: An analysis of DNA repair as a determinant
20 of survival in patients with non-small-cell lung cancer. J Natl Cancer Inst 2002; 94:1091-1099
3. Cheng L, Guan Y, Li L, et al. Expression in normal human tissues of five nucleotide excision repair genes measured simultaneously by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. Cancer epidemiology biomarkers & prevention 1999;
25 8:801-807
4. Cheng L, Guan Y, Li L, et al. Expression in normal human tissues of five nucleotide excision repair genes measured simultaneously by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. Cancer, Epidemiol Biomark Prev 8:801-807, 1999
5. Cheng L, Spitz MR, K Hong W, Wei K. Reduced expression levels of nucleotide
30 excision repair genes in lung cancer: a case-control analysis. Carcinogenesis 2000; 21: 1527-1530

-6-

6. Cheng L, Sptiz MR, K Hong W, Wei K. Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis* 21: 1527-1530, 2000
7. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Sptiz MR, Wei Q. Expression of nucleotide excision repair genes and the risk for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2002; 94:393-397
8. Conforti G, Nardo T, D'Incalci M, Stefanini M: Proneness to UV-induced apoptosis in human fibroblasts defective in transcription coupled repair is associated with the lack of Mdm2 transactivation. *Oncogene* 2000; 19:2714-2720
9. Cullinane C, Mazur SJ, Essigmann JM, et al: Inhibition of RNA polymerase II transcription in human cell extracts by cisplatin DNA damage. *Biochemistry* 1999; 38: 6204-6212
10. Furuta T, Ueda T, Aune G, et al. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res.* 62:4809-4902, 2002
11. Furuta T, Ueda T, Aune G, et al: Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res* 2002; 62:4899-4902
12. Hanawalt PC: Controlling the efficiency of excision repair. *Mut Res* 2001;485:3-13
13. Hou S-M, Fält S, Angelini S, et al: The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2002;23:599-603
14. Lord RVN, Brabender J, Gandara D, et al: Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2286-2291
15. May A, Nairn RS, Okumoto DS, et al: Repair of individual DNA strands in the hamster dihydrofolate reductase gene after treatment with ultraviolet light, alkylating agents, and cisplatin. *J Biol Chem* 1993;268:1650-1657
16. McKay BC, Becerril C, Ljungman M: p53 plays a protective role against UV-and cisplatin-induced apoptosis in transcription-coupled repair proficient fibroblasts. *Oncogene* 2001; 20:6805-6808

17. McKay BC, Ljungman M, Rainbow AJ: Persistent DNA damage induced by ultraviolet light inhibits p21^{waf1} and bax expression: implications for DNA repair, UV sensitivity and the induction of apoptosis. *Oncogene* 1998 ;17:545-555
18. Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, et al: ERCC1 mRNA levels complement
5 thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998; 16:309-316
19. Phillips DH: The formation of DNA adducts. In: Alison MR, ed. *The Cancer Handbook*. London: Nature Publishing Group; 2002:293-307
- 10 20. Rajewsky MF, Müller R. DNA repair and the cell cycle as targets in cancer therapy. In: Alison MR, ed. *The Cancer Handbook*. London: Nature Publishing Group 2002; 1507-1519
21. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, et al: ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination
15 oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001; 19:4298-4304
22. Siddik ZH: Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents: DNA-interactive alkylating agents and antitumour platinum-based drugs. In: Alison MR, ed. *The Cancer Handbook*. London: Nature Publishing Group; 2002:1295-1313
23. Spitz MR, Wu X, Wang Y, et al. Modulation of nucleotide excision repair capacity
20 by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 61:1354-1357, 2001
24. Spitz MR, Wu X, Wang Y, et al: Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61:1354-1357
25. Takebayashi Y, Nakayama K, Kanzaki A, et al: Loss of heterozygosity of nucleotide excision repair factors in sporadic ovarian, colon and lung carcinomas: implication for their roles of carcinogenesis in human solid tumors. *Cancer Letters* 2001;
25 174:115-125
26. Vogel U, Dybdahl M, Frentz G, et al. DNA repair capacity: inconsistency between effect of over-expression of five NER genes and the correlation to mRNA levels in primary lymphocytes. *Mutat Res*. 461:197-210, 2000

-8-

27. Wei Q, Cheng L, Amos CI, et al. Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 1764-1772
28. Wei Q, Cheng L, Ki Hong W, Spitz MR. Reduced DNA repair capacity in lung
5 cancer patients. Cancer Res 1996; 56:4103-4107
29. Zeng -Rong N, Paterson J, Alpert P, et al. Elevated DNA capacity is associated with intrinsic resistance of lung cancer to chemotherapy. Cancer Res 1995; 55:4760-4764.

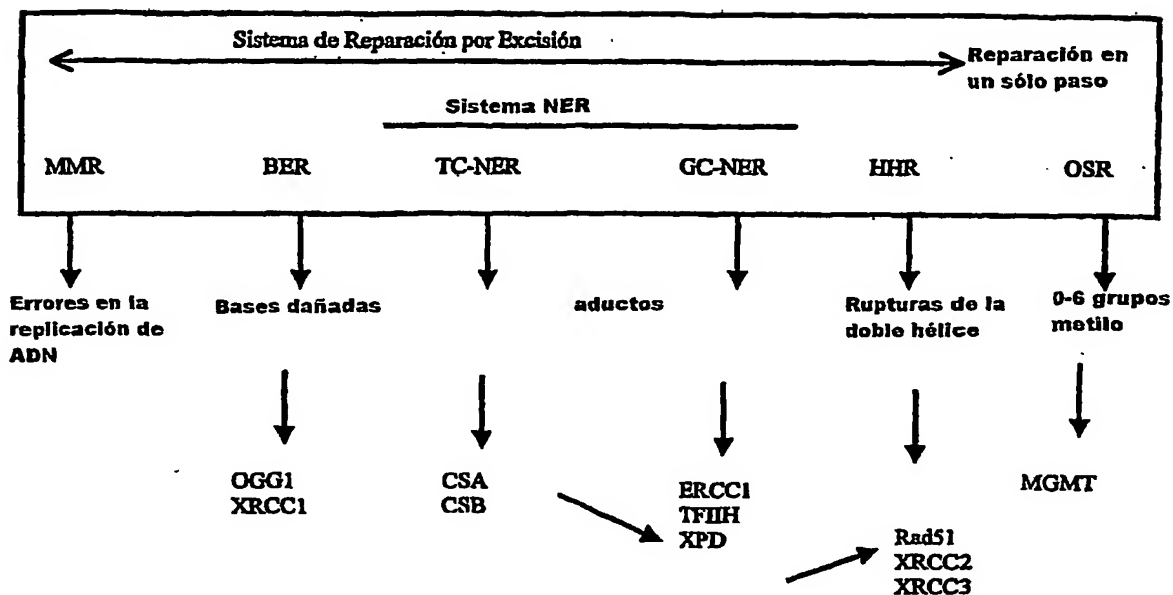
Breve descripción de la invención

10 En nuestra investigación hemos descubierto el valor predictivo farmacogenético de las variantes polimórficas del gen XP. Hemos investigado los polimorfismos de gen XPD en el exon 23 (A-C, Lys751Gln) y en el exon 10 (G-A, Asp312Asn). Las figuras 1 y 2 muestran dos ejemplos de identificación de los polimorfismos XPD en los codones 312 y 751 respectivamente realizado por secuenciación automática. El Esquema 2 muestra las
15 diversas vías metabólicas de reparación del ADN y la posición que ocupa en dichas vías el gen XPD. El interés clínico en examinar el polimorfismo XPD queda reforzado , puesto que en un cribaje de un panel de líneas celulares de diversos tumores del National Cancer Institute revela que entre XPA, XPB, XPD y ERCC1 solamente la sobreexpresión de XPD se correlaciona con resistencia a los agentes alquilantes (Aloyz et al, 2002).

20

-9-

Esquema 2. Sistemas de Reparación de DNA



Descripción detallada de la invención

5 Tipificación de los polimorfismos Lys751Gln y Asp312Asn del gen humano XPD/ERCC2.

1.- Información génica del locus ERCC2/XPD

La información de la secuencia de ADN, ARN y proteína correspondientes a este gen está detallada en la página web www.ncbi.nlm.nih.gov/locuslink/refseq.html con número de Locus ID: 2068, y que se resume a continuación:

ERCC2/XPD – excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (xeroderma pigmentosum D).

-10-

NCBI Secuencias de Referencia (RefSeq):

mARN: NM_000400

Proteína: NP_000391

GenBank Fuente: X52221, X52222

5 mARN: NM_000400

Proteína: NP_000391

GenBank Nucleotide Secuencias:

Nucleotídica: L47234 (tipo g), BC008346 (tipo m), X52221 (tipo m), X52222 (tipo m)

10 **Otros Enlaces:**

OMIM: 126340

UniGene: Hs 99987

2.- Muestras biológicas para la obtención de ADN

15 El ADN utilizado para la tipificación de los dos polimorfismos Lys751Gln y Asp312Asn ha sido obtenido de células nucleadas procedentes de sangre periférica.

Cabe destacar que para la obtención del ADN y posterior tipificación igualmente puede utilizarse cualquier otro tipo celular nucleado del organismo humano.

20 **3.- Extracción de sangre**

Se recoge sangre periférica en tubos tipo vacutainer que contienen K₃/EDTA (Becton Dickinson Systems; referencia número 36752 o 368457). A continuación se centrifuga durante 15 minutos x 2.500 rpm a temperatura ambiente y se descarta la fracción plasmática. Sobre la fracción celular se añaden 2 volúmenes de solución de lisis de eritrocitos (155mM NH₄Cl, 0,1mM EDTA, 10mM Hepes, pH=7,4) y se incuba a
25 temperatura ambiente durante 30 minutos en una plataforma giratoria. A continuación se

-11-

centrifuga la muestra durante 10 minutos x 3.000 rpm a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado celular obtenido en 1 ml de solución de lisis de eritrocitos. Se repite la centrifugación de 10 minutos x 3.000 rpm a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante. El precipitado obtenido corresponde
5 a la fracción celular libre de eritrocitos.

4.- Extracción de ADN

A partir de las células nucleadas de sangre periférica se procede a la extracción y purificación del ADN mediante el kit comercial QIAmp® DNA blood Mini kit (Qiagen;
10 referencia 51104 o 51106) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.- Tipificación de los polimorfismos Lys751Gln y Asp312Asn.

Para la tipificación del polimorfismo Asp312Asn del exón 10 se han utilizado las siguientes condiciones de PCR (volumen final de reacción de 25 µl): 900nM de cebador
15 SEQ ID NO 1: ACGCCACCTGGCCA, 900nM cebador SEQ ID NO 2: GGCGGGAAAGGGACTGG, 300nM sonda Taqman MGB™ VIC SEQ ID NO 3: CCGTGCTGCCCGACGAAGT TAMRA, 300nM sonda Taqman MGB™ 6-FAM SEQ ID NO 4: CCCGTGCTGCCCAACGAAG TAMRA, 12,5 µl de Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems; referencia 4304437) y 200ng de ADN. Los ciclos de
20 PCR (50°C x 2 minutos, 95°C x 10 minutos, [92°C x 15 segundos, 60°C x 1 minuto] x 40 ciclos) y el análisis del polimorfismo se han realizado en un equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) utilizando el programa Allelic Discrimination (Applied Biosystems).

Para la tipificación del polimorfismo Lys751Gln del exón 23 se han utilizado las
25 siguientes condiciones de PCR (volumen final de reacción de 25 µl): 900nM de cebador SEQ ID NO 5: GCCTGGAGCAGCTAGAATCAGA, 900nM cebador SEQ ID NO 6: CACTCAGAGCTGCTGAGCAATC, 300nM sonda Taqman MGB™ VIC SEQ ID NO 7: TATCCTCTGCAGCGTC TAMRA, 300nM sonda Taqman MGB™ 6-FAM SEQ ID NO 8: CTATCCTCTTCAGCGTC TAMRA, 12,5 µl Taqman Universal PCR Master Mix
30 (Applied Biosystems; referencia 4304437) y 200ng de ADN. Los ciclos de PCR (50°C x 2 minutos, 95°C x 10 minutos, [92°C x 15 segundos, 60°C x 1 minuto] x 40 ciclos) y el

-12-

análisis del polimorfismo se han realizado en un equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) utilizando el programa Allelic Discrimination (Applied Biosystems).

En ambos casos el diseño de los cebadores y las sondas se realizó mediante el programa informático PrimerExpress™ (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del proveedor y utilizando la secuencia de ADN de referencia anteriormente descrita. La especificidad de los cebadores y de las sondas fueron previamente testadas mediante el programa informático BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). En todos los casos, tanto los cebadores como las sondas mostraron especificidad única sobre cada una de las dos regiones a estudiar del gen ERCC2/XPD.

6.- Validación del análisis mediante secuenciación automática de ADN

Como validación de los resultados obtenidos se secuenciaron los fragmentos de ADN correspondientes a los polimorfismos Lys751Gln y Asp312Asn en 100 muestras de ADN que previamente se habían analizado (ver apartados anteriores).

En primer lugar se amplificó mediante la técnica de PCR el fragmento del exón 10 del gen XPD/ERCC2 donde mapa el polimorfismo Asp312Asn. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes (volumen final de 50 µl): 0,25 µM cebador SEQ ID NO: 1, 0,25 µM del cebador SEQ ID NO: 2, 5 µl de buffer de PCR (67mM Tris·HCl, 16,6mM (NH₄)₂SO₄, 0,1%-Tween 20) (Ecogen; referencia ETAQ-500), 1mM MgCl₂ (Ecogen; referencia ETAQ-500), 0,12mM PCR Nucleotide Mix (Roche; referencia 1581295), 1 unidad de EcoTaq ADN Polymerase (Ecogen; referencia ETAQ-500) y 200ng de ADN. Los ciclos de PCR utilizados fueron: 95°C x 5 minutos, [94°C x 30 segundos, 60°C x 45 segundos, 72°C x 1 minuto] x 35 ciclos, 74° x 7 minutos.

En segundo lugar se amplificó mediante la técnica de PCR el fragmento del exón 23 del gen XPD/ERCC2 donde mapa el polimorfismo Lys751Gln. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes (volumen final de 50 µl): 0,25 µM cebador SEQ ID NO: 6, 0,25 µM del cebador SEQ ID NO: 7, 5 µl de buffer de PCR (67mM Tris·HCl, 16,6mM (NH₄)₂SO₄, 0,1%-Tween 20) (Ecogen; referencia ETAQ-500), 1mM MgCl₂ (Ecogen; referencia ETAQ-500), 0,12mM PCR Nucleotide Mix (Roche; referencia 1581295), 1 unidad de EcoTaq ADN Polymerase (Ecogen; referencia ETAQ-500) y

-13-

200ng de ADN. Los ciclos de PCR utilizados fueron: 95°C x 5 minutos, [94°C x 30 segundos, 64°C x 45 segundos, 72°C x 1 minuto] x 35 ciclos, 74° x 7 minutos.

La integridad de los productos de PCR fue analizada después de electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%-TBE, y posterior tinción con bromuro de etidio 1% en un
5 transiluminador de UV.

Los productos de PCR obtenidos se utilizaron para la reacción de secuenciación tal y como se detalla a continuación: en primer lugar se purifican los productos mediante la adición de 4 µl ExoSap-IT (USB ; referencia 7820) a 10 µl del producto de PCR correspondiente y se incuba de forma secuencial a 37°C x 45 minutos y a 80°C x 15
10 minutos. A 500-600 ng de producto de PCR purificado se añaden 4 µl de la solución BigDye Terminator version 3,0 (Applied Biosystems; referencia 439024801024) y 3,2 pmoles del cebador correspondiente (en este caso se utilizaron en reacciones por separado los mismos cebadores que los utilizados en la amplificación por PCR, tanto forward como reverse). Los ciclos de PCR para esta reacción de secuenciación fueron: 94°C x 5
15 minutos, [96°C x 10 segundos, 50°C x 5 segundos, 60°C x 4 minutos] x 32 ciclos.

Una vez finalizada la reacción de secuenciación los productos se precipitan mediante la adición de 62,5 µl de Etanol 96%, 3 µl de buffer acetato sódico 3M pH=4,6 y 24,5 µl de agua bidestilada. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugan durante 30 minutos x 14.000 rpm a temperatura ambiente, se
20 descarta el sobrenadante y se realiza un lavado con 250 µl de Etanol 70%. A continuación se centrifugan las muestras durante 5 minutos x 14.000 rpm a temperatura ambiente, se descartan los restos de etanol (dejando secar completamente los precipitados), y se añade 15 µl de buffer de carga TSR (Applied Biosystems; referencia 401674). Finalmente se incuban a 95°C durante 3 minutos de forma previa a su inyección en el equipo automático
25 capilar ABI Prism 310 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los resultados de la secuenciación automática fueron analizados con el programa Sequencing Analysis 4.3.1 (Applied Biosystems).

En todos los casos analizados, los dos polimorfismos de cada una de las muestras fue secuenciado tanto con el cebador forward como con el cebador reverse, siendo en
30 todos los casos los resultados coincidentes entre ellos y también con los resultados obtenidos por análisis en PCR cuantitativa en tiempo real.

Resultados

Desde agosto del 2001 se iniciaron, con el propósito de confirmar que las variantes alélicas del XPD podían influenciar una supervivencia tras tratamiento con quimioterapia en cáncer de pulmón metastásico tres estudios en enfermos con cáncer de pulmón metastásico. Estos tres estudios distintos son el primero con gemcitabina y cisplatino, el segundo con vinorelbina y cisplatino y el tercero con docetaxel y cisplatino. También se han analizado de forma retrospectiva 100 pacientes con cáncer de pulmón localmente avanzado que efectuaron quimioterapia neoadyuvante y luego cirugía. También se han analizado alrededor de 150 pacientes en estadios iniciales que recibieron tratamiento bien con cirugía sola o con quimioterapia preoperatoria o postoperatoria y cuyo resumen también se incluye en el apéndice.

Los datos más significativos hasta la fecha son los que se obtienen del estudio de enfermos con cáncer de pulmón estadio IV que recibieron tratamiento con gemcitabina y cisplatino. Entre agosto del 2001 y julio del 2002 se incluyeron 250 enfermos de los cuales se disponen datos definitivos en 109. La Tabla I adjunta describe las características clínicas de estos pacientes que son las habituales en relación a la edad, el estado general, la histología, las metástasis. En la Tabla II se observan las frecuencias de los distintos polimorfismos. También se ha analizado el polimorfismo del gen ERCC1 en la posición 118. Se observa que las frecuencias de los polimorfismos XPD en el exon 23 y 10 constata que los genotipos homocigotos normales constituyen el 50% mientras que las variantes heterocigotas son el 40% (Tabla II). En las siguientes figuras, de forma seriada, se presenta la supervivencia global de los 109 enfermos con una mediana de supervivencia de 10.7 meses en un rango de 8.9-12.5 (Figura 3). Las diferencias según el polimorfismo del gen ERCC1 no resultan significativas (Figura 4). Sin embargo, cuando se analiza la supervivencia en función del polimorfismo XPD en el codon 751 se constata que la mediana de supervivencia para 59 pacientes con el genotipo Lys/Lys es 10.7 meses, mientras que es muy superior y todavía no se ha alcanzado la mediana en 40 pacientes heterocigotos Lys/Gln (Figura 5). También se descubre que un grupo minoritario de pacientes (10) son homocigotos para la variante Gln/Gln, la mediana de supervivencia es de 2.1 ($p=0.0009$) (Figura 5). Las mismas diferencias significativas se observan para el codon 312, véase la figura correspondiente ($p=0.003$) (Figura 6). Del

-15-

mismo modo, cuando se analiza el tiempo a la progresión, globalmente, la mediana del tiempo a la progresión es de 4 meses en un rango de 3.2-4.8 (Figura 7). No hay diferencias según el genotipo ERCC1 (Figura 8). Sin embargo, en función del genotipo, en el codon 751 se observan grandes diferencias, de tal modo que los 59 pacientes que son Lys/Lys, la mediana es de 2.9 meses, mientras que los 40 pacientes Lys/Gln la mediana se incrementa a 7.4 meses. La diferencia es muy significativa ($p=0.03$) (Figura 9). También se presenta el tiempo a la progresión del polimorfismo XPD en el codon 312, donde la diferencia en la supervivencia no resulta significativa (Figura 10). Las conclusiones de este estudio son reveladoras al diferenciar dos subgrupos de pacientes, unos con una respuesta y una supervivencia muy superior a la global donde la gemcitabina y cisplatino obtiene grandes resultados, mientras otro grupo de pacientes, dicho tratamiento estaría claramente contraindicado a la luz de los resultados tan exigüos, muy por debajo de las medianas de supervivencia que se aceptan normalmente.

-16-

Tabla I. Características Clínicas de pacientes tratados con Gem/Cis

No. Pacientes	109
Edad, años	61
(Medicina, rango)	35-82
Estado clínico (Performance Status)	
0-1	89(81.7)
2	20(18.3)
Histología	
Adenocarcinoma	52(47.7)
SCC	37(33.9)
LCUC	5(4.6)
Otros	15(13.8)
Fase	
IIIb	29(26.6)
IV	80(73.4)
Efusión Pleural	19(17.4)
Cirugía	10(9.2)
Radioterapia	11(10.1)
Metástasis	
Hígado	9(8.3)
Pulmón	43(39.4)
Hueso	21(19.3)
SNC	16(14.7)
Adrenal	18(16.5)
Pie	7(6.4)
Nódulos linfáticos	23(21.1)
Otros	13(11.9)

Tabla II. Respuesta y genotipos ERCC1 y XPD

5

Respuesta	
Respuesta completa	5(5.3)
Respuesta parcial	29(30.9)
Respuesta completa + Respuesta parcial	34(36.2)
Enfermedad estable (Stable Disease)	14(14.9)
Progresiva Enfermedad (Progressive Disease)	46(48.9)
No Evaluable	15
ERCC1	
T/T	14(12.8)
C/T	52(47.7)
C/C	43(39.4)
XPD23	
Lys/Lys	59(54.1)
Lys/Gln	40(36.7)
Gln/Gln	10(9.2)
XPD10	
Asp/Asp	51(46.8)
Asp/Asn	48(44)
Asn/Asn	10(9.2)

En un segundo estudio en cáncer de pulmón estadio IV, que también se inició en agosto del 2001, se han analizado cerca de 100 enfermos tratados con cisplatino y vinorelbina y de los cuales se dispone de resultados preliminares. El efecto de la vinorelbina en función del genotipo XPD revela que los pacientes Lys/Lys con mal pronóstico cuando se tratan con gemcitabina y cisplatino, en este caso, cuando se utiliza vinorelbina ocurre lo contrario y se obtiene un tiempo a la progresión de 10 meses en el grupo de pacientes Lys/Lys cuando en el estudio que se tratan con gemcitabina y cisplatino, dicha median de tiempo a la progresión es de tan solo 2.9 meses. Véase las correspondientes gráficas 11 y 12.

Finalmente se muestran también los resultados del polimorfismo XPD en pacientes con cáncer de pulmón localmente avanzado, estadio III, donde una vez más

-18-

varía la supervivencia en función del genotipo. Al añadir docetaxel a la combinación de gemcitabina y cisplatino, el tiempo a la progresión resulta significativamente superior en los pacientes homocigotos Lys/Lys o Lys/Lys más Asp/Asp. Véase las figuras correspondientes 13 y 14.

5

Aplicación clínica

Estos resultados señalan de forma inequívoca por primera vez, la predicción farmacogenética individual de los enfermos con cáncer de pulmón. En primer lugar, el genotipo XPD Lys751Gln predice un efecto y una supervivencia sustancialmente superior a la normal cuando se tratan con gemcitabina y cisplatino. En segundo lugar, dicha combinación está claramente contraindicada en los otros genotipos Lys751Lys y Gln751Gln. Los resultados clínicos también demuestran que los pacientes Lys751Lys responden muy favorablemente a la combinación de vinorelbina y cisplatino o de docetaxel y cisplatino. Finalmente y en tercer lugar, se identifica que un grupo minoritario de pacientes con el genotipo Gln751Gln tienen muy mala supervivencia a cualquier combinación de quimioterapia con cisplatino y por lo tanto, se deben tratar con combinaciones sin cisplatino.

El test genético del polimorfismo XPD es absolutamente necesario para la adecuada selección de fármacos antes de la administración de la quimioterapia en pacientes con cáncer y muy especialmente en cáncer de pulmón.

Descripción de las Figuras

Figura 1: Polimorfismo XPD 312 con sustitución G → A que causa un cambio de aminoácido Asp → Asn en el codon 312.

Figura 2: Polimorfismo XPD 751 con sustitución A → C con cambio de aminoácido Lys → Gln en el codon 751.

Figura 3: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Supervivencia global a Gem/Cis.

Figura 4: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Supervivencia según genotipo ERCC1.

Figura 5: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Supervivencia según XPD 751.

Figura 6: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Supervivencia según XPD 312.

-19- -

Figura 7: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Tiempo a la progresión.

Figura 8: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipo ERCC1.

Figura 9: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipo XPD 751.

Figura 10: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipo XPD

5 312.

Figura 11: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipo XPD 751 para vinorelbina/cisplatino.

Figura 12: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipo XPD 751 para gemcitabina/cisplatino.

10 Figura 13: Abcisas: semanas; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipo XPD 751 para Gem/Cis/Docetaxel.

Figura 14: Abcisas: semanas; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipos XPD 751 y 312.

15

-20-

REIVINDICACIONES

- 1.- Dispositivo de ensayo para detección la predisposición genética a responder al tratamiento de fármacos antitumorales útiles para el cáncer de pulmón, basado en la
5 detección de polimorfismos y/o pérdida de heterozigosis en el gen reparador ERCC2/XPD, cuyo locus está definido por la secuencias de GenBank X52221 y X52222, caracterizado por comprender al menos una de las sondas oligonucleotídicas seleccionadas entre SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6.
- 10 2.- Dispositivo de ensayo, caracterizado porque las sondas se usan como cebadores de mapeo de muestras de ADN humano en técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR).
- 3.- Dispositivo de ensayo, caracterizado porque las sondas se usan como cebadores de
15 mapeo de muestras de ADN humano en técnica de secuenciación automática.
- 4.- Dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por detectar los polimorfismos Lys751Gln o Asp312Asn, respectivamente para cada par de cebadores.
20
- 5.- Dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el fármaco antitumoral es una combinación de cisplatino con un segundo compuesto antitumoral seleccionado entre gemcitabina, vinorelbina o docetaxel.
- 25 6.- Oligonucleótidos cebadores para detectar la predisposición genética a la respuesta a fármacos antitumorales, caracterizados por las secuencias representadas por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6.
- 30 7.- Oligonucleótidos según la reivindicación 6 caracterizados porque el fármaco antitumoral es una combinación de cisplatino con un segundo compuesto antitumoral seleccionado entre gemcitabina, vinorelbina o docetaxel.

-21-

8.- Uso como cebadores para detectar la predisposición genética a la respuesta a fármacos antitumorales de los oligonucleótidos representados por SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8.

5

9.- Uso según la reivindicación 8, caracterizado porque el fármaco antitumoral es una combinación de cisplatino con un segundo compuesto antitumoral seleccionado entre gemcitabina, vinorelbina o docetaxel.

1/14

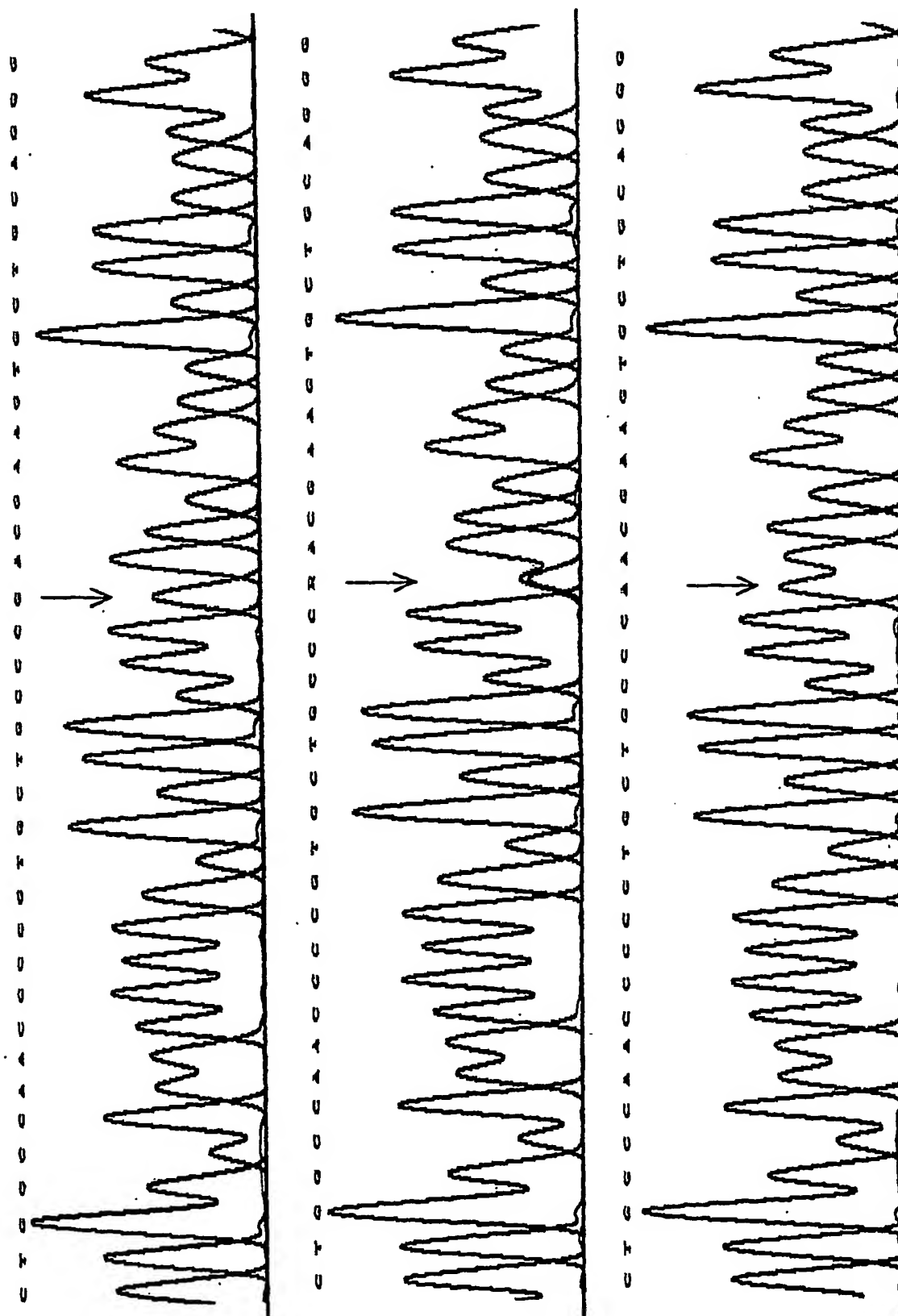


FIG. 1

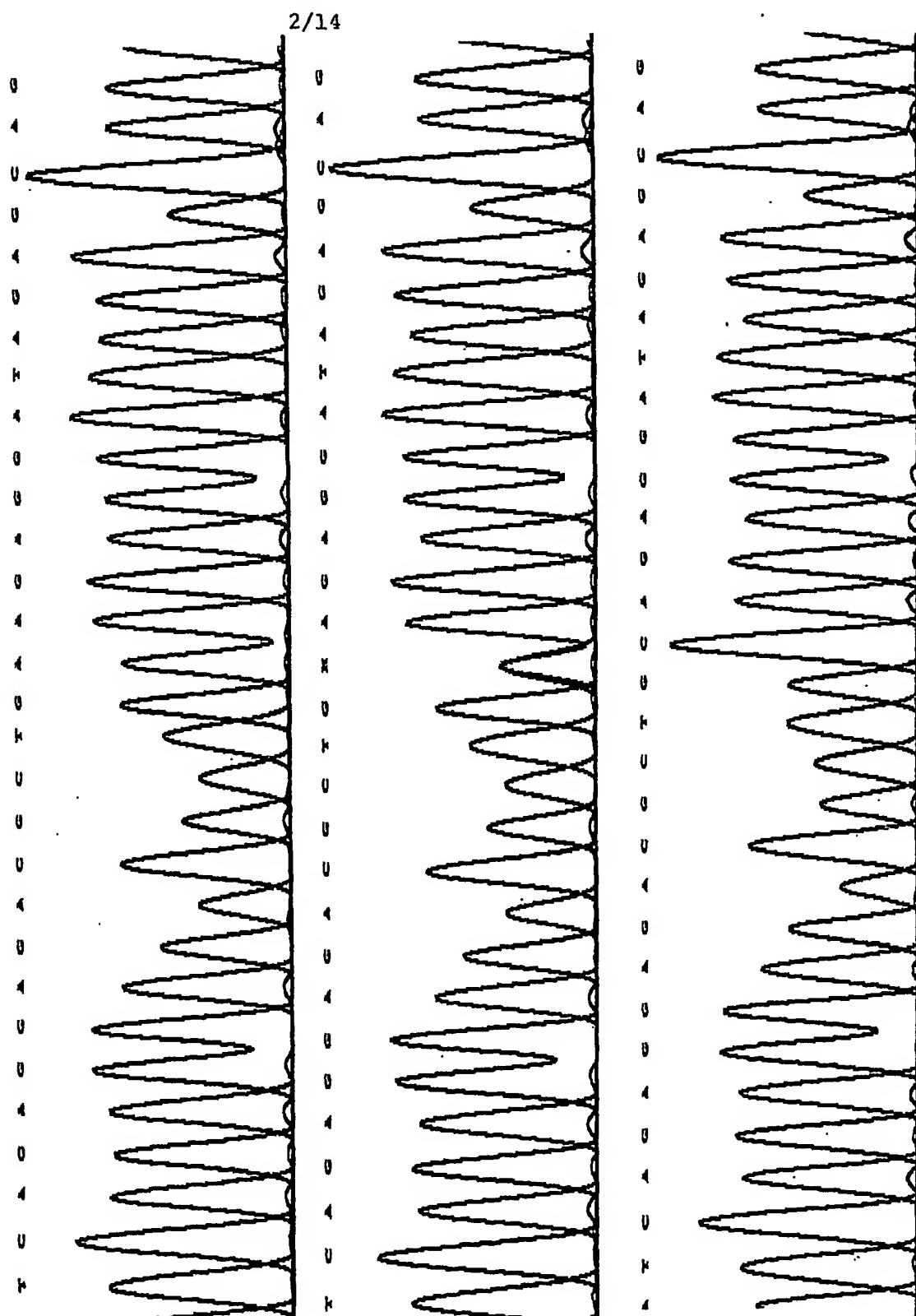
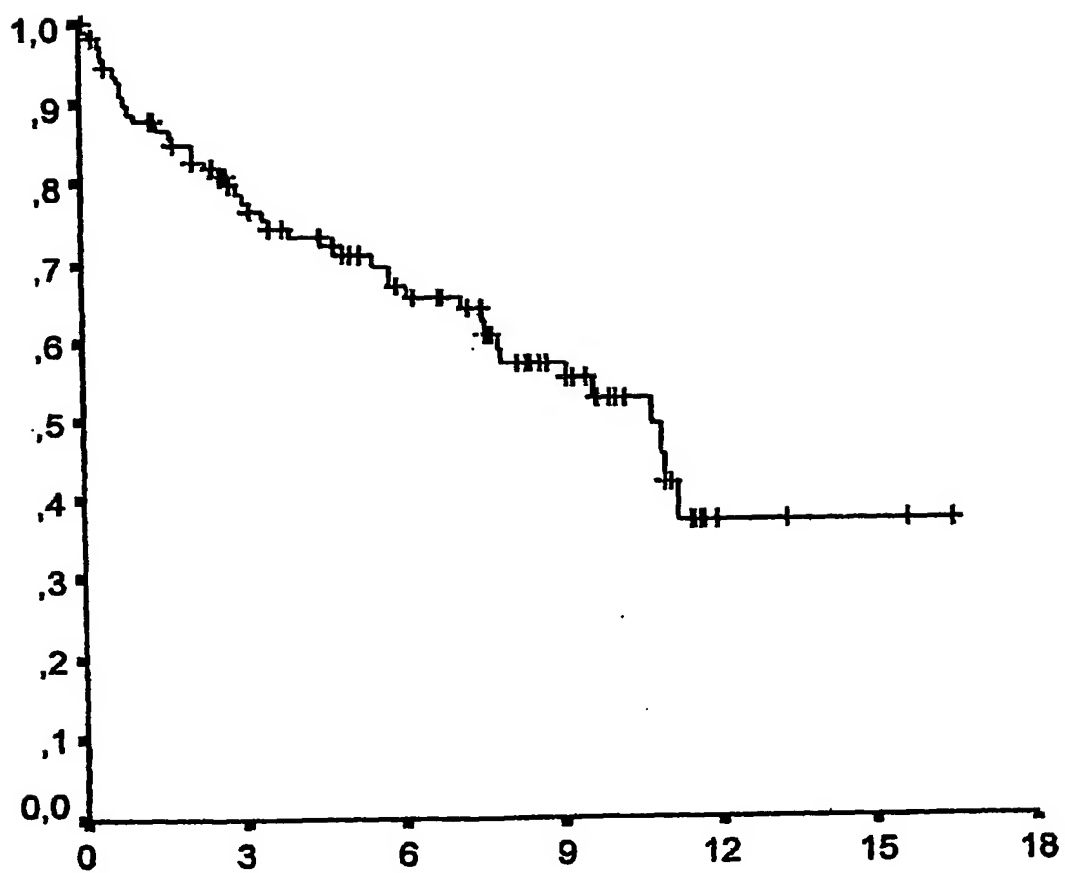


FIG. 2

3/14

**FIG. 3**

4/14

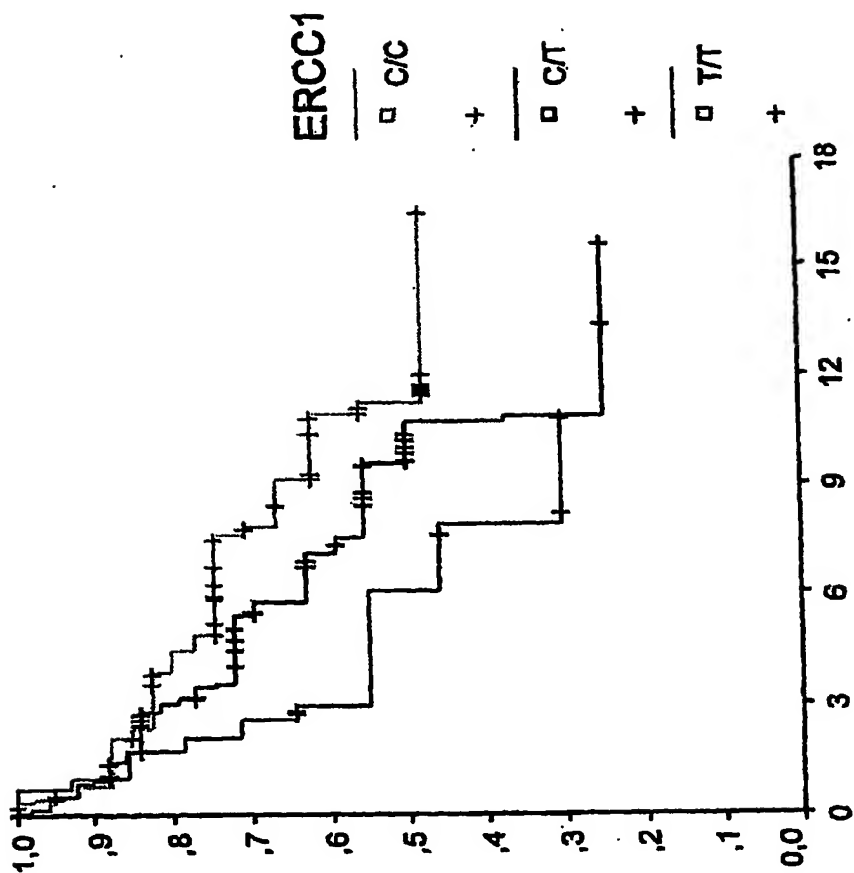
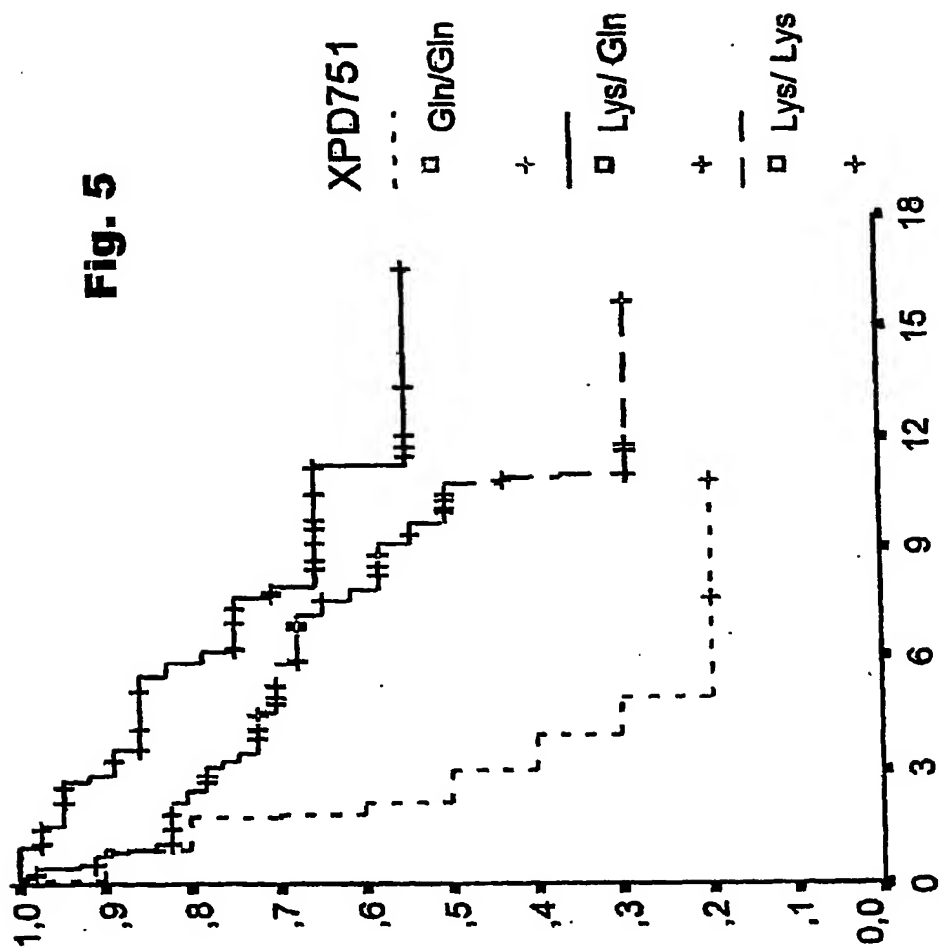


Fig. 4

	N° Pacientes	Mediana	Intervalo Confianza 95%	Probabilidad
T/T	14	6.1	0.5-11.8	0.12
C/T	52	9.6	6.4-12.8	
C/C	43	11.2	-	

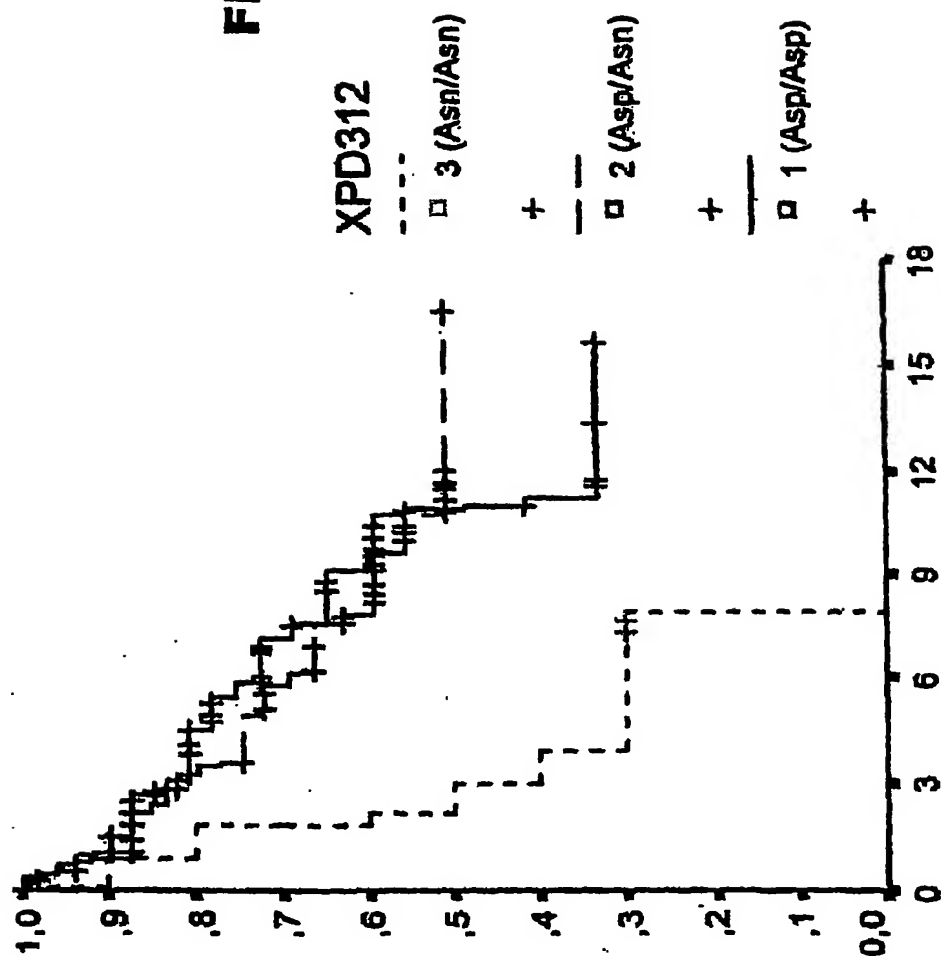
5/14



	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo Confianza 95%	Probabilidad
Lys/Lys	59	10.7	7-14.4	0.0009
Lys/Gln	40	No alcanzada		
Gln/Gln	10	2.1	0.3-3.9	

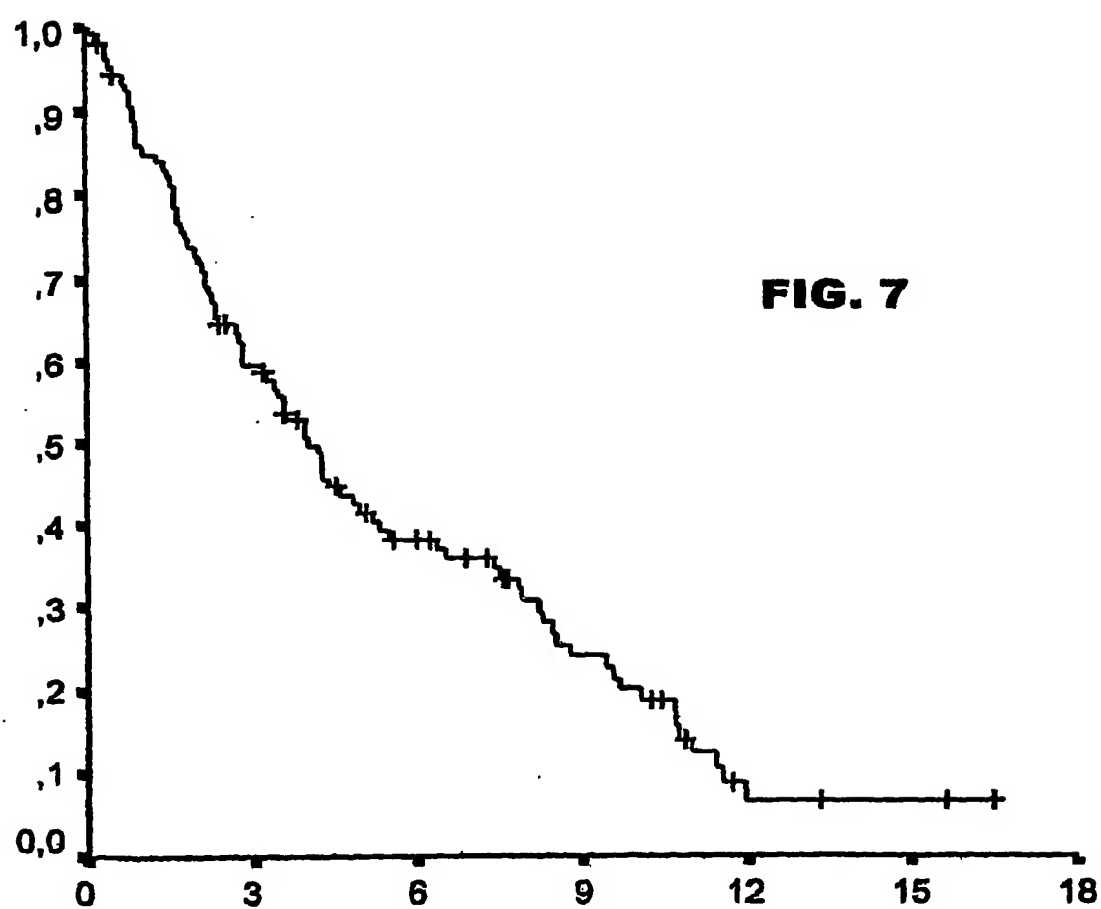
6/14

FIG. 6

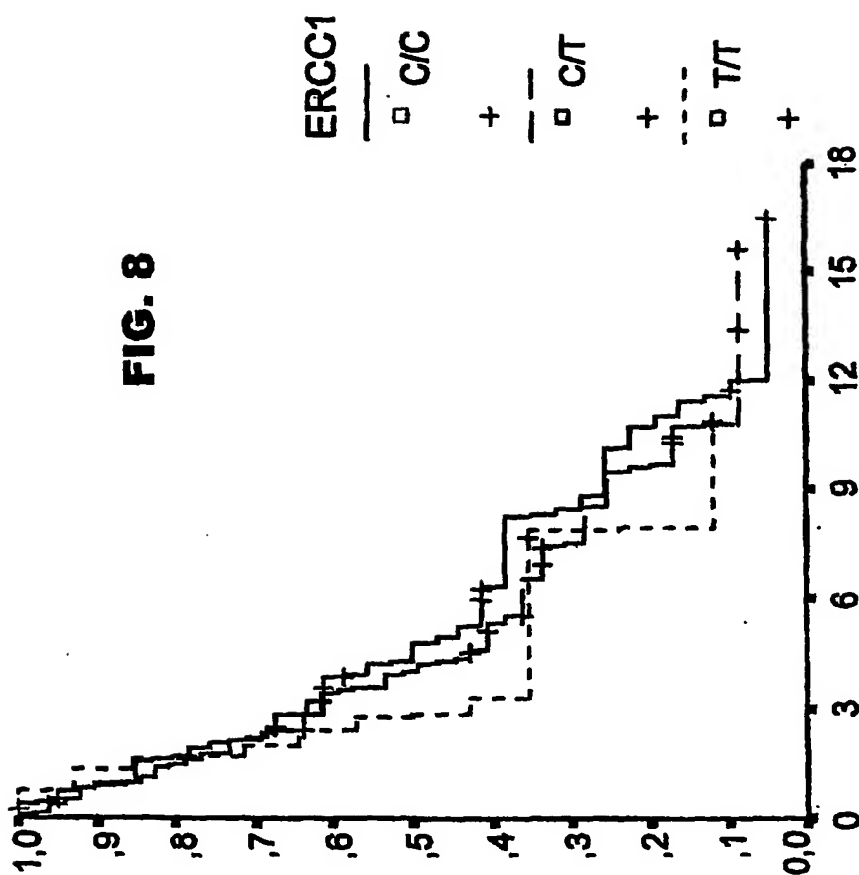


	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo Confianza 95%	Probabilidad
Asp/Asp	51	10.9	8.9-12.9	0.003
Asp/Asn	48	No alcanzada		
Asn/Asn	10	2.1	0.3-3.9	

7/14



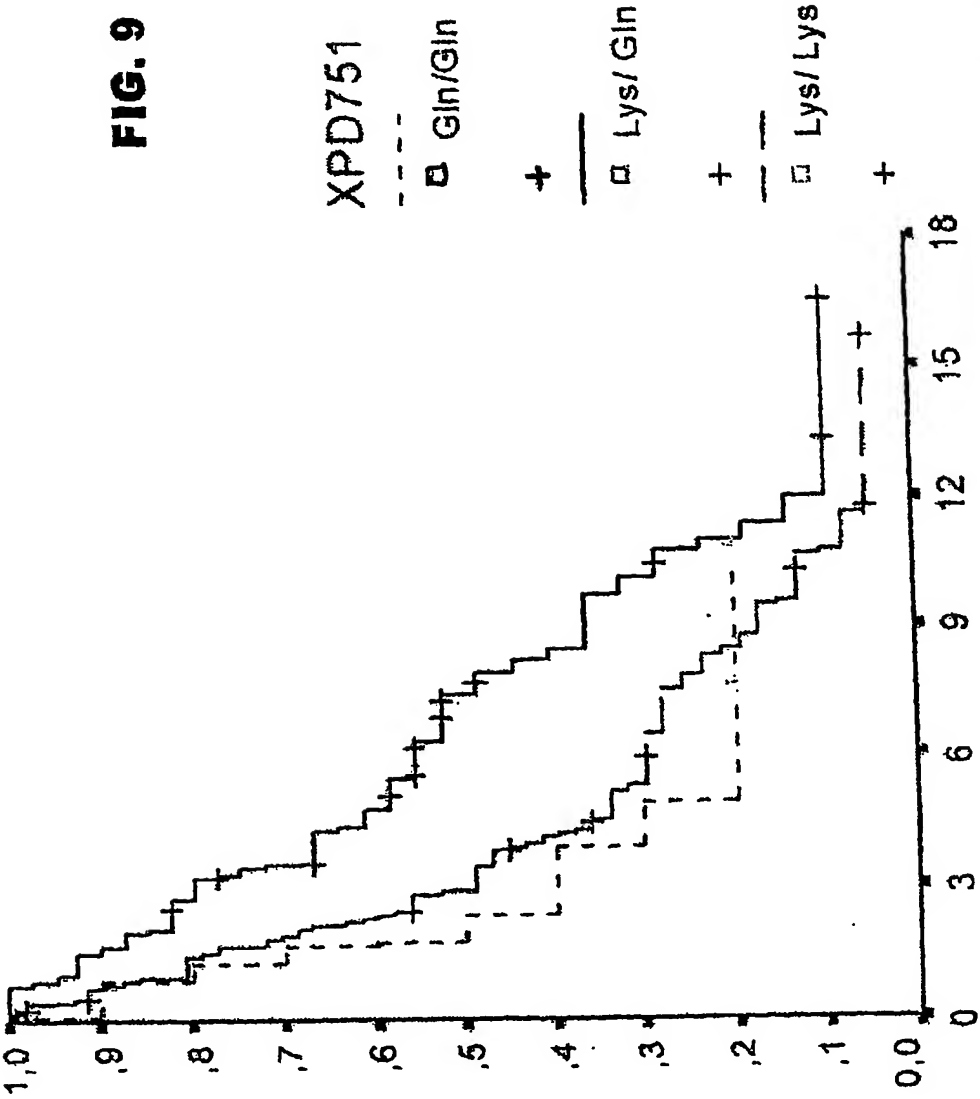
8/14



	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo Confianza 95%	Probabilidad
T/T	14	2.7	1.9-3.6	0.75
C/T	52	4	3.1-4.9	
C/C	43	4.3	2.9-5.7	

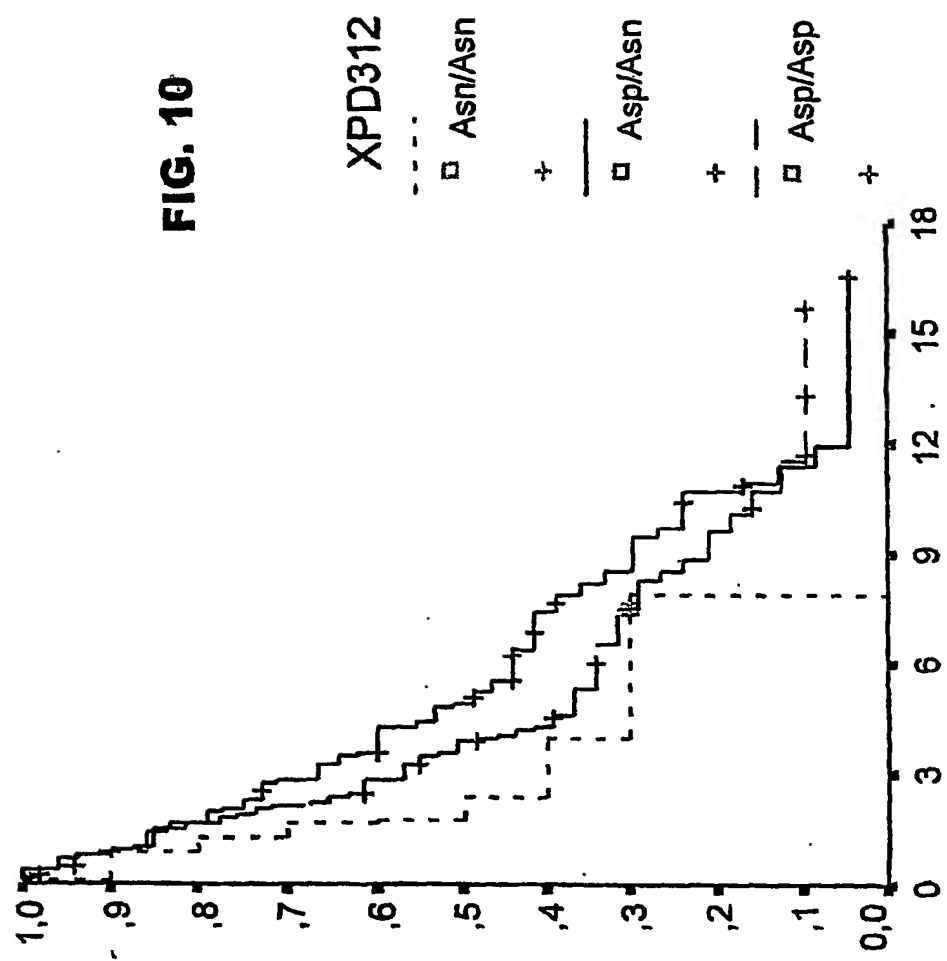
9/14

FIG. 9



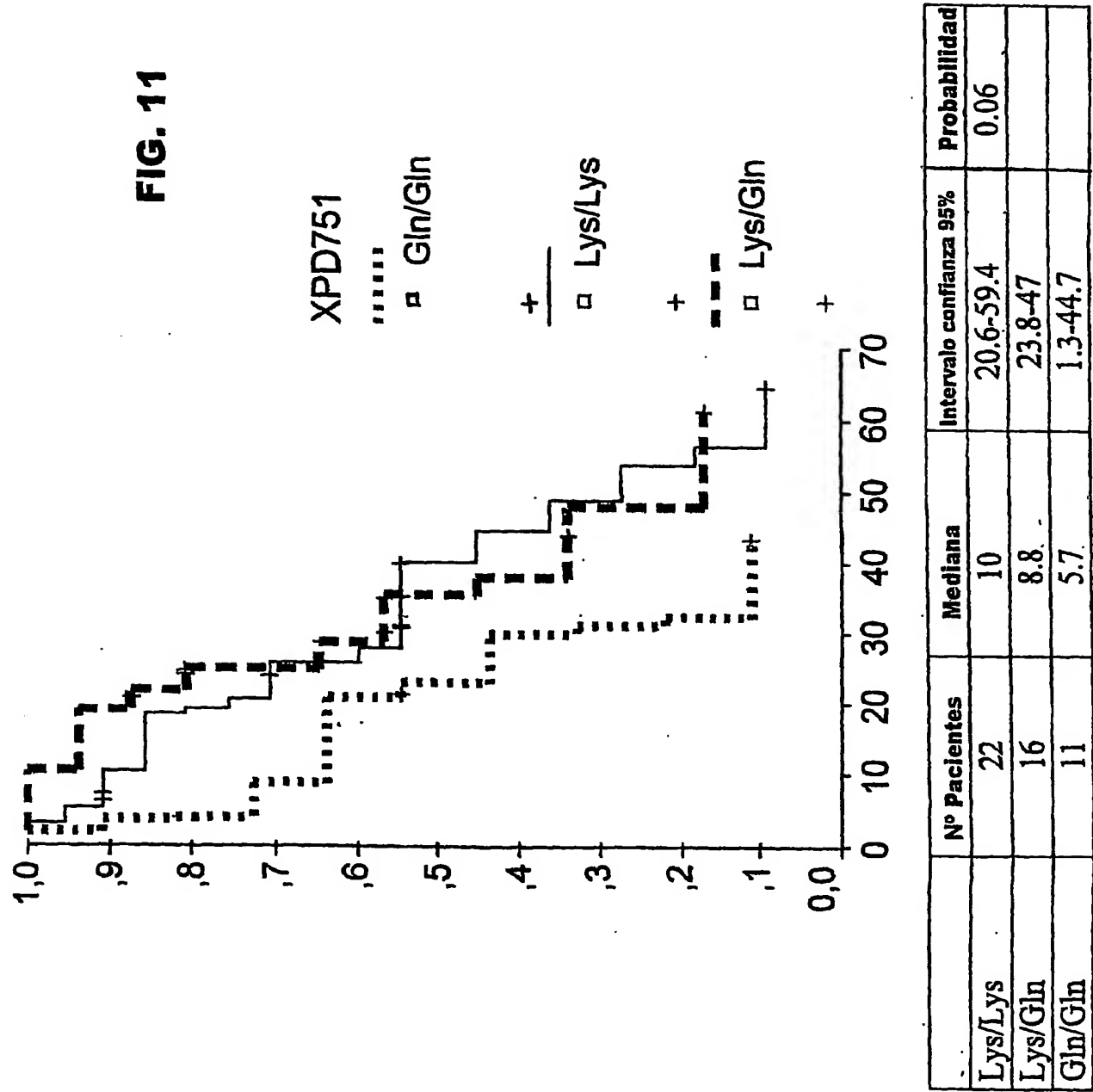
	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo confianza 95%	Probabilidad
Lys/ Lys	59	2.9	1.3-4.4	0.03
Lys/ Gln	40	7.4	3.8-11	
Lys/ Gln				

FIG. 10



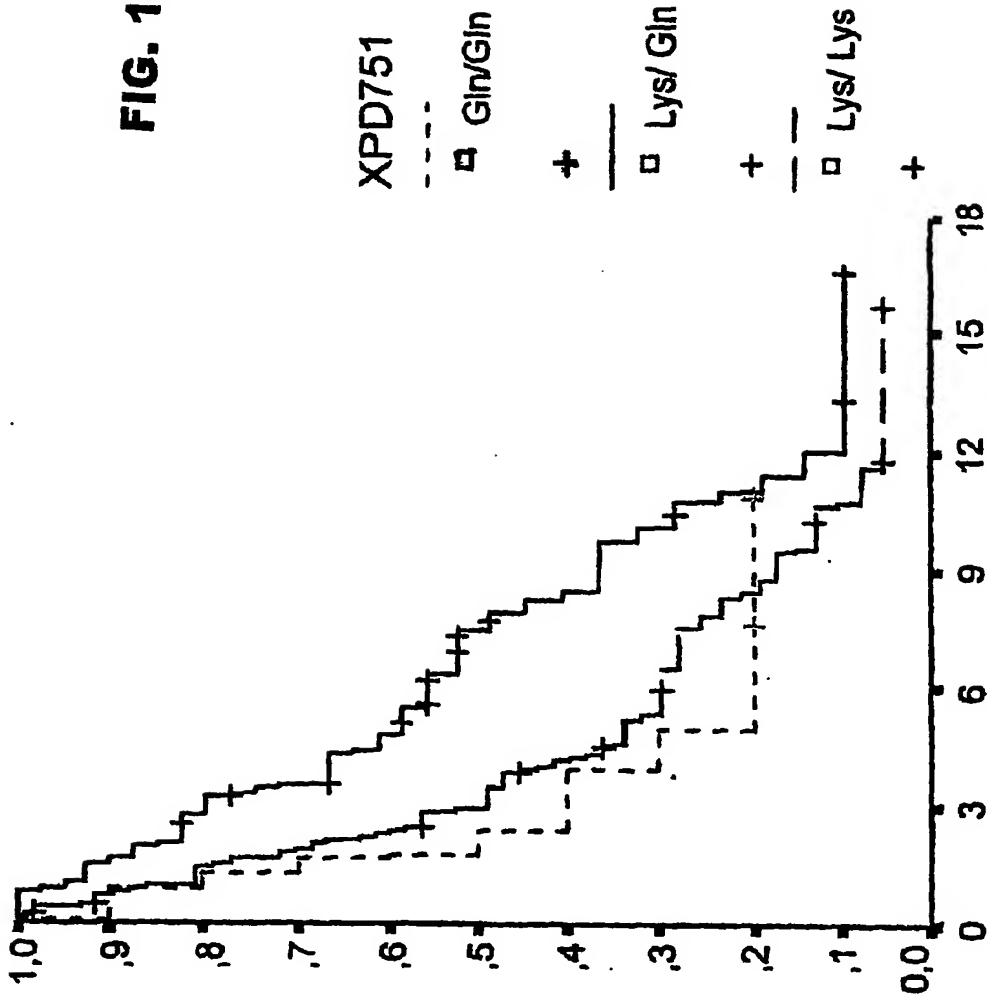
	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo confianza 95%	Probabilidad
Asp/Asp	51	3.8	2.6-5.1	0.32
Asp/Asn	48	4.9	3.4-6.4	
Asn/Asn	10	1.7	0.6-2.9	

FIG. 11



12/14

FIG. 12



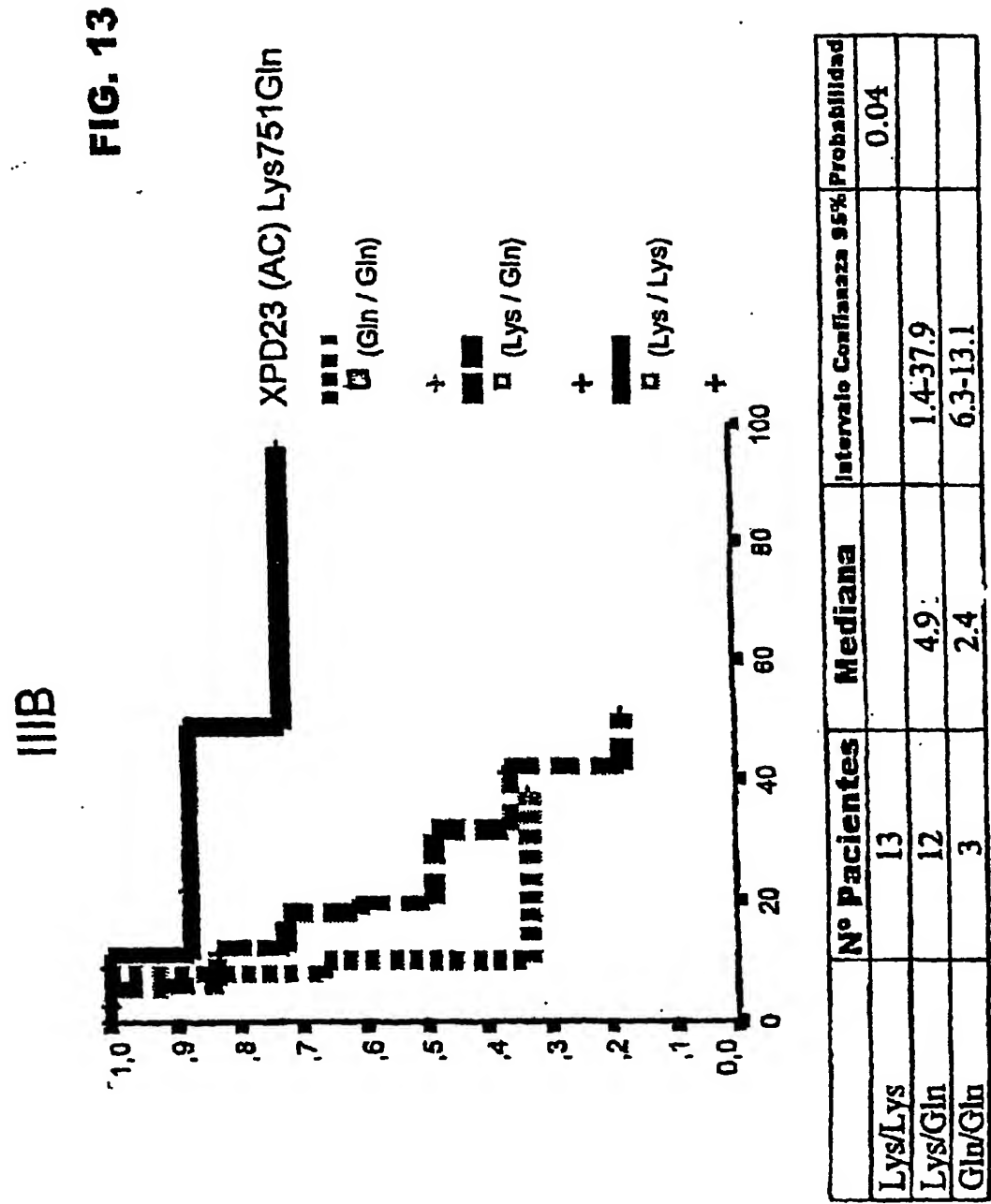
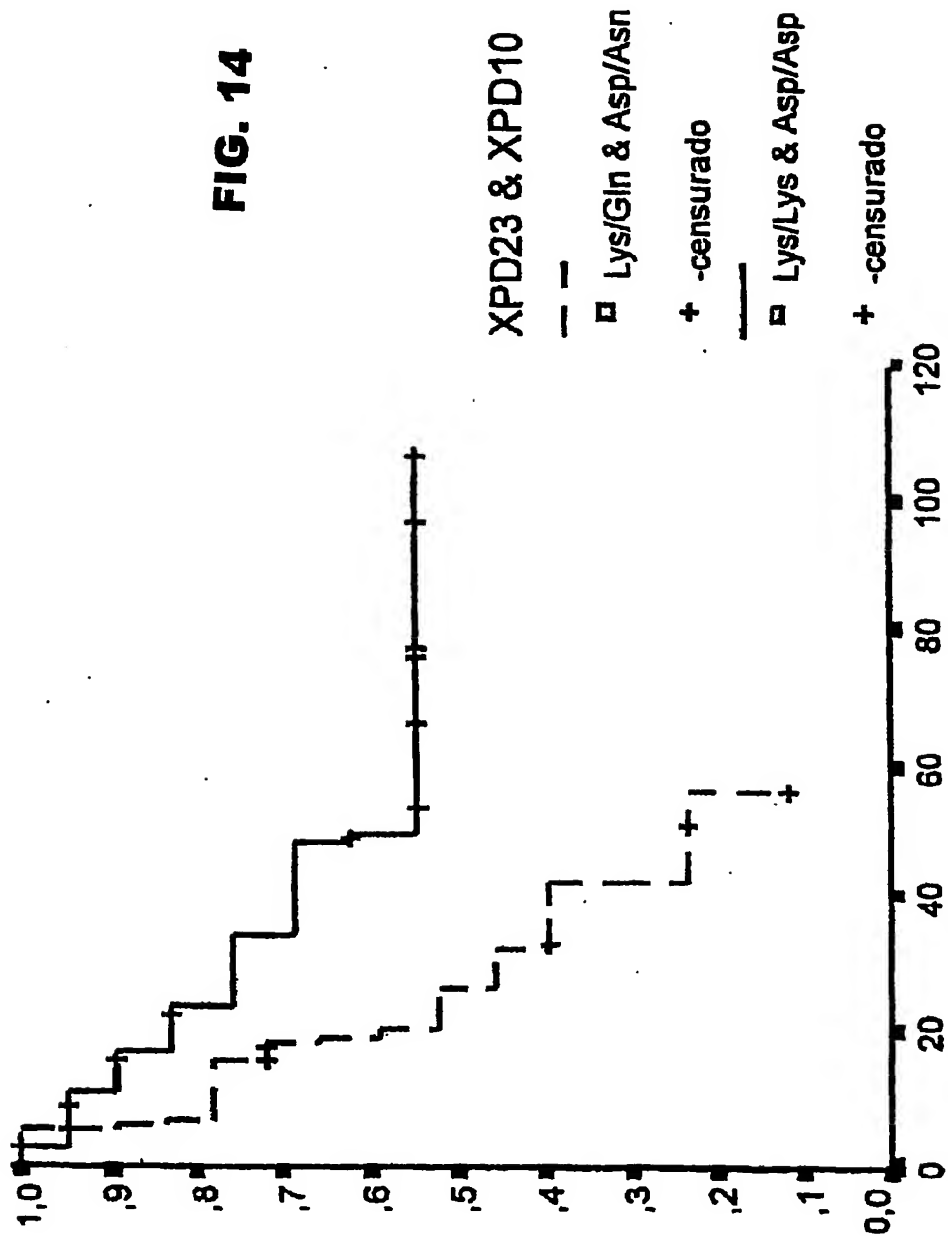


FIG. 14



	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo Confianza 95%	Probabilidad
Lys/Lys & Asp/Asp	23	No alcanzada		0.02
Lys/Gln & Asp/Asn	18	6.4	2.4 – 10.4	

- 1 -

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DEL
CANCER DE PULMON

<120> "DISPOSITIVO DE ENSAYO DE POLIMORFISMOS DEL GEN XPD/ERCC2
PARA LA CORRECTA ADMINISTRACIÓN DE QUIMIOTERAPIA EN CANCER DE
PULMON"

<130> P-99918

<160> 8

<210> SEQ ID NO.: 1

<211> 15

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acgcccacct ggcca

15

<210> SEQ ID NO.: 2

<211> 17

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcgggaaag ggactgg

17

- 2 -

<210> SEQ ID NO.: 3

<211> 19

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Sonda Taqman MGBTM VIC

<400>

ccgtgctgcc cgacgaagt

19

<210> SEQ ID NO.: 4

<211> 19

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Sonda Taqman MGBTM 6-FAM

<400>

cccgtgctgc ccaacgaag

19

<210> SEQ ID NO.: 5

<211> 22

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcctggagca gctagaatca ga

22

- 3 -

<210> SEQ ID NO.: 6

<211> 22

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cactcagagc tgctgagcaa tc

22

<210> SEQ ID NO.: 7

<211> 16

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Sonda Taqman MGBTM VIC

<400>

tatcctctgc agcgtc

16

<210> SEQ ID NO.: 8

<211> 17

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Sonda Taqman MGBTM 6-FAM

<400>

ctatcctctt cagcgtc

17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ ES 2003/000666

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARK DJ. et al. "A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer". Cancer Res. Dic 2001. Vol 61, N° 24, pages 8654-8658	1-9
X	PARK JY. et al. "Lys751Gln polymorphism in the DNA repair gene XPD and risk of primary lung cancer"; Lung Cancer. 2002. Vol 36, pages 15-16	1-9
X	SPITZ MR. et al. "Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients". Cancer Res. Feb 2001. Vol 61, n° 4, pages 354-1357	1-9
X	Xing DY. et al. "Polymorphisms of the DNA repair gene XPD and risk of lung cancer in a Chinese population". Lung Cancer. Nov 2002. Vol 38, n° 2,	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February 2004 (2004.02.10)

Date of mailing of the international search report

12 May 2004 (2004.05.12)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O

Authorized officer

J. Manso Tomico

Facsimile No.

Telephone No.

+ 34 91 3495352

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2003/000666

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	pages 123-129 FURUTA T. et al. "Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells". Cancer Res. Sep 2002, Vol 62, páginas 4899-4902.	1-9
A	WO 9725442 A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GmbH) 09.01.1997.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2003/000666

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9725442 A1	09.01.1997	EP0784096 A1	16.07.1997
		EP0873426	28.10.1998
		JP2000502908T	14.03.2000

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2003/000666

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12Q1/68

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

CIP⁷ C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

WPI, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	PARK DJ. et al. "A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer". Cancer Res. Dic 2001. Vol 61, Nº 24, páginas 8654-8658.	1-9
X	PARK JY. et al. "Lys751Gln polymorphism in the DNA repair gene XPD and risk of primary lung cancer"; Lung Cancer. 2002. Vol 36, páginas 15-16.	1-9
X	SPITZ MR. et al. "Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients". Cancer Res. Feb 2001. Vol 61, nº 4, páginas 354-1357.	1-9
X	Xing DY. et al. "Polymorphisms of the DNA repair gene XPD and risk of lung cancer in a Chinese population". Lung Cancer. Nov 2002. Vol 38, nº 2,	1-9

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T"

documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&"

documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

10 Febrero 2004 (10.02.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

12 MAY 2004 12.05.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

J. Manso Tomico

Nº de teléfono + 34 91 3495352

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2003/000666

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
	páginas 123-129.	
A	FURUTA T. et al. "Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells". Cancer Res. Sep 2002, Vol 62, páginas 4899-4902.	1-9
A	WO 9725442 A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GmbH) 09.01.1997.	1-9

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2003/000666

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9725442 A1	09.01.1997	EP0784096 A1	16.07.1997
		EP0873426	28.10.1998
		JP2000502908T	14.03.2000